



 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

1000

DEUTSCHE
PATENT-AN

PATENT AND

© Offenlegungsschrift
© DE 39 37 649 A 1

⑦ Aktenzeichen: P 39 37 649-4
⑧ Anmeldestag: 11.11.89
⑨ Meldenummer: 16 - 5 81

② W.O.
C 12 N 1/20
C 12 P 1/04
C 08 G 61.06

A 61 K 9:58
 A 61 L 17,910
 A 61 I 27,000
 A 61 L 31,000
 ./ C06J 5,000
 C06L 67,04
 (C 2P 1,04,
 C12P 1 05.1.02,1 C
 1 06S 1:365.1 36)

DE 39 37 649 A 1

© Ammeider

Boehringer Ingelheim KG 6507 Ingelheim, DE

② Erinner:

Steinbachel, Alexander, Dr., 3400 Göttingen, DE;
Schlegel Hans-Günther, Prof Dr., 3405 Bovenden,
DE; Timm, Amel, 3400 Göttingen, DE

④ Polyester auf der Basis von 4-Hydroxyalkansäuren und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft Polymere auf der Basis von 4-Hydroxyalkanoaten, das Verfahren zu ihrer Herstellung, die dafür benötigten Monoglycidylamine und die Verwendung der erstandenen Polyäther.

DE 3937649 A 1

BUNDESBUCHSEITE 21 81 108 610 624

10

x

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Polyeste^r auf der Basis von 4-Hydroxyalkansäuren, Verfahren zu ihrer Herstellung und deren Anwendung.

Insbesondere betrifft die Erfindung Polyester auf der Basis von C₆ bis C₁₄-Hydroxyalkansäuren, hergestellt aus 4-Hydroxybuttersäure und 4-Hydroxy-

buttersäure, d.h. polye^rer, das bestimmte Bakterien in der Lage sind, Polyester an 3-Hydroxybuttersäure-Resten unterflüssig zu sintetisieren. Derartige Polye^reinden sich als Granula an, welche mit einem Objekt in Berührung gebracht werden können, um dieses zu entkalken. Beispielsweise kann ein Kühler oder ein Motorraum eines Automobils mit einem solchen Polyester gegen präzisatisch vor (Dawes, E.A. und P.J. Senior, Amer. Pat. 3,721,261).

Es ist bekannt, daß bestimmte Bakterien in der Lage sind, Polyester an 3-Hydroxybuttersäure-Resten unterflüssig zu sintetisieren. Derartige Polye^reinden sich als Granula an, welche mit einem Objekt in Berührung gebracht werden können, um dieses zu entkalken. Beispielsweise kann ein Kühler oder ein Motorraum eines Automobils mit einem solchen Polyester gegen präzisch vor (Dawes, E.A. und P.J. Senior, Amer. Pat. 3,721,261).

Die bisher gezeigte, die mikrobiologische Verfahren schaffenden biologisch abbaubaren Polye^re aus gestrigener, aliphatischer Hydroxylalkansäure (Alkansäure), welche eine Hülle von Alkansäurecarbonsäuregruppen aufweist, ist ein Copolymer, der entweder zu 3-Hydroxybuttersäure (3HB) und 4-Hydroxybuttersäure (4HB) aus zufälligen unvernetzten Produkten besteht (Kunst, E. A., Amer. Pat. 3,721,261; Senor, P.J. und Dawes, E.A., Amer. Pat. 3,721,261; oder ein zufälliges Gemisch aus zwei verkeimten 3-Hydroxyalkansäuren enthalten (IDL-OS - 38 11 231; EPA 28 11 231).

Es ist kein Herstellungsverfahren für konkretere Polye^re aus 4-Hydroxyalkansäuren bekannt. Reisertbare Polye^re finden große Verwendung im Bereich der reichen Entwicklung. Als zufällige Ausprodukte solcher Polye^re, die zu nicht verwendbaren Produkten abgesetzt werden, zeigt das Interesse an erwerbbarer Polye^ren mit genau definiertem Struktur.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung Polye^r auf der Basis von 4-Hydroxyalkansäuren mit definerter Struktur herzustellen.

Als erstes Schritt wurde gefunden, daß in Abhängigkeit von der Art des Keimens C₆ bis Mono-carbonaten vorwiegend des Keimlands C₆ bis C₁₄ insbesondere 4-Hydroxybuttersäure, als Ausgangsstoff zur Herstellung von 4-Hydroxybuttersäure benötigt wird. Auch von Polye^rs, die durch einen Gehalt an >40 mol %, >60 mol %, >70 mol % oder >90 mol % an 4-Hydroxybuttersäure getestet wurden, wurde verneint, daß es sich um ein Polye^r handelt, das mit Hilfe von bestimmten Mikroorganismen und der durch vorliegendes Methoden erfolgen kann.

Ein derartige Synthese zu solchen Polye^ren war nicht möglich. Es wurde jedoch festgestellt, daß in diesem heterogenen Stand der Technik, zum einen auswählbaren Copolymeren erhalten werden können, die Verwendung von 4HB als Rohstoff führt zu einem von den anderen her bekannten 4HB-Copolymeren (Kunstka et al., 1969, loc. cit.) und zum anderen die Densivitheit zu poly(3HB) bekannt ist. Die mikrobielle Herstellung von unterschiedlichen Polye^rs und deren Anwendung ist in dem vorliegenden Patent (Dawes, E.A. und P.J. Senior, 1973, loc. cit.) und in Form von Poly(3HB) gut dokumentiert (z.B. Dawes, E.A. und P.J. Senior, 1973, loc. cit.) oder die auch 4HB verwerten können und bekannterweise nur reiche

Copolymeren erzielen, die mehrheitlich einen begrenzten Bereich zu einem zufälligen Anteil von Poly(3HB) besitzen (2-37 mol %); die erfindungsmäßigen Polye^re aus 4-Hydroxybuttersäure enthalten >90 mol % 4-Hydroxybuttersäure, hergestellt werden können, wenn die Mikroorganismen im Wachstummedium eine entsprechende 4-Hydroxybuttersäure angeboten wird.

Die mikrobielle Herstellung von 4-Hydroxybuttersäure, unterflossen werden, kleinen Mengen zu nehmen, die solche Polye^re erreichen können, setzt in vollem Maße voraus.

Selbst und auch die Mikroorganismen, die zur Synthese einer Hydroxylalkansäure, an den entsprechenden Hydroxylalkansäure abhängig und Ge-

genstand der vorliegenden Erfindung zu auch solche, die die Fähigkeit dieser Mikroorganismen erhalten haben können.

Gemäß vorliegender Erfindung kann die Herstellung der erfindungsmäßigen Polye^r durch ein Verfahren erzielt werden, wie es die folgenden Schritte umfaßt:

1. Anreicherung und Selektionierung einer Reinkultur eines Mikroorganismus, um die Herstellung einer erfindungsmäßigen Mikroorganismen, die die Synthese eines 4-Hydroxybuttersäure, vorzugsweise der Konstitution C₆ bis C₁₄, insbesondere 4-Hydroxybuttersäure, beschleunigen können;

2. Züchtung der Reinkultur dieser Mikroorganismen, entweder in Batch-, fed-Batchverfahren (Handbuch der Biotechnologie, Prave, P. Fack, U. Seifert, Vol. 1, 1984) oder in kontinuierlichem Verfahren, oder in kontinuierlichem Verfahren, in einem Kulturmehrern, wobei dies eine der genannten 4-Hydroxyalkansäure, insbesondere 4-Hydroxybuttersäure, in die Kulturmischung hinzugefügt wird. Nachdem die Kulturmischung vorliegen kann, erhält derart eine Anreicherung der entsprechenden Polye^r Hydroxybuttersäure, möglich;

3. Die erfindungsmäßigen Mikroorganismen aus dem Zeitraum der Herstellung der erfindungsmäßigen Mikroorganismen

Für die Herstellung der erfindungsmäßigen Polye^r müssen eigene und alle dazugehörigen Mikroorganismen, insbesondere Bodenmikroorganismen, verschiedene artliche Bodenmikroorganismen oder die davon aufgrund bekannter Mutation- und Rekombinationstechniken neu erzeugte 4-Hydroxybuttersäure, möglich;

4. Kultivierung 4-Hydroxybuttersäure, möglich;

5. Anreicherung der entsprechenden Polye^r Hydroxybuttersäure, möglich;

6. Die erfindungsmäßigen Mikroorganismen aus dem Zeitraum der Herstellung der erfindungsmäßigen Mikroorganismen

Für die Herstellung der erfindungsmäßigen Polye^r müssen eigene und alle dazugehörigen Mikroorganismen, insbesondere Bodenmikroorganismen, verschiedene artliche Bodenmikroorganismen oder die davon aufgrund bekannter Mutation- und Rekombinationstechniken neu erzeugte 4-Hydroxybuttersäure, möglich;

7. Anreicherung und Selektionierung einer Reinkultur eines Mikroorganismus, um die Herstellung der erfindungsmäßigen Mikroorganismen, die die Synthese eines 4-Hydroxybuttersäure, vorzugsweise der Konstitution C₆ bis C₁₄, insbesondere 4-Hydroxybuttersäure, beschleunigen können;

8. Züchtung der Reinkultur dieser Mikroorganismen, entweder in Batch-, fed-Batchverfahren (Handbuch der Biotechnologie, Prave, P. Fack, U. Seifert, Vol. 1, 1984) oder in kontinuierlichem Verfahren, oder in kontinuierlichem Verfahren, in einem Kulturmehrern, wobei dies eine der genannten 4-Hydroxyalkansäure, insbesondere 4-Hydroxybuttersäure, in die Kulturmischung hinzugefügt wird. Nachdem die Kulturmischung vorliegen kann, erhält derart eine Anreicherung der entsprechenden Polye^r Hydroxybuttersäure, möglich;

9. Die erfindungsmäßigen Mikroorganismen aus dem Zeitraum der Herstellung der erfindungsmäßigen Mikroorganismen

DE 39 37 049 A1

gewasert von 50 mM Nitrat für 10 Minuten bei 4°C mitwirken, danach in ein Mineraliumedium (wie unter B angegeben) ohne Ammoniumchlorid mit 0,5% Frischzucker abgelebt (Schubert, P. et al., 1986, bei der Anwendung dieses Verfahrens wurde die Zellteilung unterdrückt). Die Zellen wurden abgetrennt, aus dem erhaltenen Zellsuspension wurde das gewaschene Ammonium durch Zentrifugation in einem Peristaltik-Zentrifuge (7500 rpm) abgetrennt (Schubert, P. et al., 1988, bei der Anwendung dieser Methode wurde eine gewisse Zellteilung und bessere Überlebensrate der Zellen erzielt). Das Getrennte Ammonium wurde mit 0,1 M Permease auf MM-Fraction-Paten mit 0,005% (v/v/v) NH₄Cl plaziert wurden. Die Kollokien der gesuchten Bakterien wurden einzeln ausgetragen als doppelttrockene Milbypolymeren. Für diese Kollokien (Milbypolymere SK 21.3 berechnet), wurde für die weitere Aufarbeitung verwandt:

B. Kultivierung (Batch-Kultur)

2 ml einer stationären Kultur der aus Schritt A entnommenen Zellen (0,25 g/ml Trockenzellmasse) wurden in einem Kultivierer bestens aus dem Boden extrahiert (0,5 g) und Penovit 5 g gelöst in einem Liter deionisiertem Wasser, wurden in 50 ml eines Mineraliumediums der Zusammensetzung:

Na ₂ HPO ₄ + 12 H ₂ O	0,0 g	10
KH ₂ PO ₄	0,5 g	
NH ₄ Cl	0,5 g	
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,2 g	
CaCO ₃ × 2 H ₂ O	0,02 g	
Fe(OH) ₃ · CuO	0,01 g	

gelöst in einem Liter deionisiertem Wasser, welches 10 min einer Spülungseinheit enthielt, der Zusammensetzung:

Triplex II	500 mg	10
CaCO ₃ × 7 H ₂ O	200 mg	
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	10 mg	
MgSO ₄ × 6 H ₂ O	3 mg	
Fe(OH) ₃	3 mg	
CaCO ₃ × 6 H ₂ O	20 mg	
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	1 mg	
NH ₄ Cl × 6 H ₂ O	2 mg	
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	3 mg	

gelöst in einem Liter deionisiertem Wasser, supplementiert mit 0,5% (v/v/v) Hydroxylsäure (Natriumsalz), sterilisiert und unter aeroben Bedingungen in einem Schüttelkocher bei 30°C für 45 h kultiviert.

C. Charakterisierung des erhaltenen Polymeren

Bei dem Schritt B erhaltenen Bakterien wurden über Zentrifugation gereinigt, mit Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen, gefroren und lyophilisiert. Die Zellen wurden anschließend ohne Methanol vor dem Schmelzen der Zelle (Schubert, P. et al., 1977 - 1982, 1983) ausgeworfen. Der Gehalt und die Zusammensetzung des in der Zelle akkumulierten Polymers wurde über Gaschromatographie am Methylenstein-Hydroxylsäuremuster als Referenzschablonen

bestimmt (Brandl, H. et al., 1986 loc. cit.). Die Analyse des erhaltenen Polymeren ergab einen Polymergehalt von 18,6 Gew-% der Trockenzellmasse. Das Polymer bestand ausschließlich aus Einheiten von 4-Hydroxybutyrate (4HB) Monomeren und lag somit als Homopolymer vor.

Beispiel 2

Es wurde wie unter Beispiel 1 angegeben verfahren, außer das anstatt des Mutanszahns SK 211 der Wildtyp-Stamm A. europeus IMP22 verwendet wurde.

Die Analyse des vom Wildtyp-Stamm erhaltenen Polymeren ergab einen Polymergehalt von 21,9 Gew-% der Trockenzellmasse. Das Polymer bestand aus 52,1 mol-% 4HB und 75 mol-% 3-Hydroxybutyrate (3HB).

Beispiel 3

Es wurde Beispiel 1 D und C wiederholt, außer das ein Wildtyp-Stamm von *Pseudomonas* sp. anstelle des Mutanszahns SK 211 verwendet wurde. Die Analyse des aus dem dieser Pseudomonas-Mutanz erhaltenen Polymeren ergab einen Polymergehalt von 18 Gew-% der Trockenzellmasse. Das Polymer bestand aus 52,1 mol-% 4HB und lag somit als Homopolymer vor.

Beispiel 4

Die Kultivierung erfolgte in diesem Fall in einem Zweikammerverfahren unter Verwendung des Wildtyp-Stamms A. europeus Stamm IMP22. Im ersten Schritt wurde ein Wildtyp-Stamm IMP22 in einem Komplexmedium (wie unter Beispiel 1 angegeben) für 48 h bei 30°C unter sterilen Bedingungen inkubiert.

Im zweiten Schritt wurden diese zellulären Zeanzide in einem weiteren Komplexmedium (wie unter Beispiel 1, jedoch ohne NH₄Cl, sogenannt 1/3 Medium) wurde ein 4-Hydroxybutyrate (2%, w/v) zugesetzt. Beide Kulturen, die aufgrund des Fehlens einer Zellwand nicht voneinander trennbar waren, wurden bei 30°C für 48 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Bakterien wurden über Zentrifugation gereinigt, mit Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen, gefroren und lyophilisiert. Die Zusammensetzung des in der Zelle akkumulierten Polymeren erfolgte wie unter Beispiel 1 angegeben. Der Gehalt an erhaltenem Copolymer betrug 42 Gew-% der Trockenzellmasse. Das Polymer bestand aus 78,9 mol-% 4HB und 21,1 mol-% 3HB.

Beispiel 5

Es wurde Beispiel 1 B und C wiederholt, außer das Aztreobacter von DSM 1721 anstelle von A. europeus IMP22 (Beispiel 1) verwendet wurde. Die Analyse des aus dem dieser Aztreobacter erhaltenen Polymeren ergab einen Polymergehalt von 14,6 Gew-% der Trockenzellmasse. Das Copolymer bestand aus 73,5 mol-% 4HB und 26,5 mol-% 3HB.

Polymeranalyse:

1. Polymer auf der Basis von 4-Hydroxybutyrate;
2. Polyester nach Anspruch 1, d. h. gekennzeichnet.

X

zeichnet, daß sie vermehrte Polyester und
1 Polyesters nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Gehalt an > 40 mol-% einer
4 Hydroxylgruppe aufweist;

4. Polyesters nach Anspruch 1, bei 3, dadurch gekennzeichnet, daß die 4-Hydroxylgruppen $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{C}_6\text{H}_4$ sind;

5. Polyesters nach Anspruch 1, bei 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie an 4-Hydroxylwasserstoff-Liebster befreit sind;

6. Verfahren zur Herstellung eines Polyesters nach Anspruch 1 bis 5 unter Verwendung von Makroorganismen;

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Makroorganismen Bodenkraut sind;

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Makroorganismen ausgewählt sind aus den Gruppen der Schleimpilze, Schimmelpilze, Actinomyceten, Nematoden, ¹⁰
Actinomyceten, ¹¹ Ascomyceten, Basidiosporen, ¹²
Acarophagen, Agaricophagen, Rhizosporen, ¹³
Paracoccidioides;

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, ¹⁴
dadurch gekennzeichnet, daß die Makroorganismen Mykorrhizale sind;

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, ¹⁵
dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen und die entsprechenden Mykorrhizale Gräser mit einer 4-Hydroxylgruppe ausgerüstet, angereichert oder kultiviert werden und nach der Zerlese ¹⁶
die Polyesters nach Anspruch 1 bis 3 gewonnen werden;

11. Polyester, herstellbar nach einem Verfahren ge-¹⁷
äßt Anspruch 6 bis 10;

12. Verwendung eines Mikroorganismus gemäß ei-¹⁸
nem der Ansprüche 6 bis 9 zur Herstellung von ¹⁹
Polyesters nach Anspruch 1 bis 3;

13. Mikroorganismen zur Herstellung eines Poly-²⁰
esters nach Anspruch 1 bis 3;

14. Mikroorganismus nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es Bodenmikroorganismen ²¹
sind;

15. Polyester, herstellbar nach Anspruch 14, dadurch ²²
gekennzeichnet, daß sie ausgewählt und zu den Gruppen Alkaligen, Pseudomonas, Azobac-²³
ter, Nocardi, Actinomyces, Bacillus, Azorebacter, ²⁴
Agrobacter, Rhizobacter und Streptomyces gehört;

16. Der Mikroorganismus SK 2811 im Alkaligen ²⁵
europus Stamm 1M172, DSM 565, herstellt am 03.11.1985;

17. Verwendung eines Polyesters nach Ansprüchen ²⁶
1 bis 5 in der Chemie, Pharmazie zur Veraplan-²⁷
lung und Makroverapsulation von Substanzen und ²⁸
Wirkstoffen, zur Herstellung abbaubarer Verap-²⁹
lungs- und Geschmacksstoffe und Flammkörpern;³⁰

18. Flammkörper, bestehend aus einem Polyester ³¹
nach Anspruch 1 bis 5;

— Leerseite —

X

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.